

⑫ 公開特許公報(A) 平4-2963

⑤ Int. Cl.⁵G 01 N 33/553
A 61 B 10/00

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)1月7日

B
V7906-2J
7831-4C
7831-4C※

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全9頁)

⑭ 発明の名称 レーザ磁気免疫測定法

⑯ 特 願 平2-104662

⑰ 出 願 平2(1990)4月20日

⑱ 発 明 者 星 野 光 利 東京都千代田区内幸町1丁目1番6号 日本電信電話株式会社内

⑲ 発 明 者 有 島 功 一 東京都千代田区内幸町1丁目1番6号 日本電信電話株式会社内

⑲ 発 明 者 藤 原 幸 一 東京都千代田区内幸町1丁目1番6号 日本電信電話株式会社内

⑲ 発 明 者 柴 田 修 一 東京都千代田区内幸町1丁目1番6号 日本電信電話株式会社内

⑳ 出 願 人 日本電信電話株式会社 東京都千代田区内幸町1丁目1番6号

㉑ 代 理 人 弁理士 志賀 正武

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

レーザ磁気免疫測定法

2. 特許請求の範囲

抗原あるいは抗体に磁性体微粒子を標識として付加した磁性体標識体と、検体たる抗体あるいは抗原とを抗原抗体反応させる第1の工程と、

この第1の工程で得られる磁性体標識体と検体との複合体である磁性体標識検体を含む溶液に磁界を作用させてレーザ光照射領域に磁性体標識体を誘導、濃縮させる第2の工程とを少なくとも含むレーザ磁気免疫測定法において、

前記磁性体微粒子として、安定ラジカル化合物と微小粒子との結合体を用いることを特徴とするレーザ磁気免疫測定法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

この発明は、抗原抗体反応を利用し、極めて微量の検体から特定の抗体または抗原を定量的に検

出するレーザ磁気免疫測定法に関する。

〔従来の技術〕

本発明者等の開発によるレーザ磁気免疫測定法については、既に特願昭61-224567号、特願昭61-252427号、特願昭61-254164号等の先願発明に開示されている。

このレーザ磁気免疫測定法は、磁性体微粒子としてマグネタイト(Fe_3O_4)微粒子あるいはマグネタイト微粒子表面をデキストランなどの糖やプロテインAなどの蛋白質等の生理活性物質で被覆した微粒子を用い、これにIgG抗体などの抗体(または抗原)を結合させて磁性体標識体を作成する。ついで、この磁性体標識体を検体であるインフルエンザウイルスなどの抗原(または抗体)と抗原抗体反応させて検体たる抗原(または抗体)を磁気標識化して、磁性体標識体を作成する(第1の工程)。

ついで、第5図に示すように、この磁性体標識体を分散した液体を容器1に入れ、この容器1を電磁石2と磁極片3で構成された傾斜磁界発生装

置にセットする。電磁石2を励磁すると、磁極片3直下の液面の磁界が最も高いため、磁性体標識検体はこの部分に濃縮される。この部分の磁界が数kG以上になると、磁性体標識検体に対する垂直上方向への磁気吸引力と液体の表面張力のバランスによって、液面が微視的に隆起する。この隆起部分4に斜め方向からレーザー光5を入射し、その液面からの反射光6をスクリーンに受けると、干渉縞が現れる。この干渉縞の光強度を測定することによって、磁性体標識検体の量を知るものである。

このレーザー磁気免疫測定法は、磁気濃縮効果のため、極めて高い感度($1 \times 10^{-13} \text{ g/ml}$)で微量のウイルスなどを検出する特長を有する。

ところで、このレーザー磁気免疫測定法で用いられる磁性体微粒子としては、上述のようにマグネタイト微粒子あるいはプロテインAなどの生理活性物質被覆マグネタイト微粒子があるが、マグネタイト微粒子は、粒径の単分散化が難しいと言う問題点があり、プロテインAで被覆されたマグネ

タイト微粒子は、粒子同士の凝集が不可避的に起こってしまう。このため、抗原抗体反応によって捕捉できる抗原数が少なくなり、相対的に抗体価の低下を招き、感度の一層の向上が困難であると言う不都合がある。

〔発明が解決しようとする課題〕

よって、本発明の課題は、凝集が生じることがなく、単分散性の良好な磁性体微粒子を用いたレーザー磁気免疫測定法を提供することにある。

〔課題を解決するための手段〕

かかる課題は、磁性体微粒子として、安定ラジカル化合物と微小粒子との結合体を用いることで解決される。

以下、本発明を詳しく説明する。

本発明での磁性体微粒子を構成する一方の成分である安定ラジカル化合物としては、空気中あるいは水溶液中で安定なラジカルを有する化合物が用いられ、具体的に第1表に示すN-オキシルー2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン誘導体、第2表に示す5員環のピロリジン誘導体、第3表

-3-

に示すN-オキシルー4, 4-ジメチルオキサゾリジン誘導体などがある。

なお、第1表中の「TEMPO」は、2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン-1-オキシルを表し、第2表中の「PROXYL」は、2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン-1-オキシルを表し、第3表中の「DOXYL」は、4, 4-ジメチルオキサゾリジン-1-オキシルを表し、これら表中の“A-1”, “B-1”, “C-1”等の符号は、第2図ないし第4図に記載の符号に対応する化合物の構造式を表している。

また、磁性体微粒子を構成する他方の成分である微小粒子としては、粒径が $5 \mu\text{m}$ 以下の親水性ポリマー粒子、シリカビーズ、コロイダルシリカ、DNA(デオキシリボ核酸)などの非磁性の微小な粒子が用いられる。親水性ポリマーとしては、ポリ-2-ヒドロキシメタクリレート、ポリ-2-ヒドロキシアクリレート、ポリグリシジルアクリレート、ポリグリシジルメタクリレート、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミドなどが挙

-4-

げられる。

安定ラジカル化合物と微小粒子との結合には、安定ラジカル化合物の安定ラジカルを破壊しない反応であればどのようなものでもよく、従来から知られている種々の有機反応を用いることができ、例えば、微小粒子を懸濁させた水懸濁液に、安定ラジカル化合物を溶解した水溶液を加え、攪拌する方法などがある。

かくして得られた安定ラジカル化合物と微小粒子とからなる結合体は、このままあるいはデキストランなどの糖、プロテインAなどの蛋白等の生理活性物質で被覆された状態で、磁性体微粒子として用いられる。抗原あるいは抗体との反応は、従来のレーザー磁気免疫測定法と同様である。

このような安定ラジカル化合物と微小粒子とからなる結合体は、5kG程度の磁極に引き寄せられる。したがって、レーザー磁気免疫測定法での磁性体微粒子として従来のマグネタイト粒子と同様に使用される。

第1図は、この結合体を水に分散させ、この分

-5-

-6-

散液について第5図に示した装置により磁界を印加し、レーザ光を照射して得られた干渉縞の強度を示すグラフであり、結合体では安定化ラジカル化合物濃度に比例して干渉縞強度が大きくなることがわかる。一方、安定化ラジカル化合物のみでは、干渉縞の形成が起こらず、その濃度を高めても干渉縞強度の変化は生じない。勿論、微小粒子単独でも磁極に吸引されることはなく、干渉縞の形成はおこらない。

本発明でのレーザ磁気免疫測定法では、微小粒子としてDNAを用いることができるため、DNAと安定化ラジカル化合物との結合体を磁性体微粒子として用いることができる。このため、ハイブリッド形成したDNAプローブに安定ラジカル化合物化学的に結合させることによってサザン法(Southern blot technique)での電気泳動を行ったのち、更にこのレーザ磁気免疫測定法を行って、従来法よりも高感度化されたDNAプローブ測定を行う事ができ、ウイルス診断プローブ、オリゴリボヌクレオチドによる遺伝子検出法、ウイルス

核酸のアッセイ法、遺伝子発現のアッセイ法、核酸塩基配列における突然変異の検出法等に用いることができる。これらの方法によれば、サザン法工程で必須的に用いられる P^{32} 等の放射性同位元素を扱う必要が無く、有利となる。

以下、具体例を示す。

(実施例1)

微小粒子としての粒径 $0.5 \sim 3 \mu m$ の範囲のポリグリシジルメタクリレート微粒子の水懸濁液に、安定化ラジカル化合物としての4-アミノ-2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン-1-オキシル水溶液を添加し、1時間室温で攪拌し、ポリグリシジルメタクリレートのグリシジル基と4-アミノ-2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン-1-オキシルのアミノ基を共有結合させ、両者の結合体を得た。この結合体の表面にプロテインAを被覆し、さらにプロテインAの表面にインフルエンザウイルスに対するウサギ免疫血清から単離したIgG抗体を結合させて、磁性体標識体を得た。

化合物でも同様の効果が得られた。

(実施例2)

粒子表面が水酸基あるいはアミノ基であるコロイダルシリカを微小粒子として用い、これの表面に4-アミノ-2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン-1-オキシルを実施例1と同様に結合させて、結合体とした。この結合体に γ -グロブリン抗体を結合させて磁性体標識体とした。この磁性体標識体の抗体と、抗原を結合したポリマービーズの抗原とを抗原抗体反応によって結合させ、コロイダルシリカを抗原を中心にしてサンドイッチ様に結合させた。抗原と結合していないコロイダルシリカを遠心分離後、抗原と結合している磁性体標識検体を実施例1と同様に測定したところ、抗原を 10^{-12} モルまで検出できた。

(発明の効果)

以上説明したように、本発明のレーザ磁気免疫測定方法にあつては、安定化ラジカル化合物と微小粒子との結合体を磁性体微粒子として用いるものであるため、磁性体微粒子同士の凝集が起こら

ついでこの磁性体標識体にインフルエンザウイルスを抗原抗体反応で結合させて、磁性体標識検体を得た。この磁性体標識検体を懸濁した試料を、第5図に示した測定装置によって測定したところ、5 kGの磁場の印加により、レーザ光での干渉縞が形成された。

これにより、安定化ラジカル化合物と微小粒子との結合体を用いることによって、従来からのレーザ磁気免疫測定が可能であることがわかった。

また、上記の結合体を長期間水中に懸濁させておいたが、結合体同士の凝集は認められなかった。

また、ポリグリシジルメタクリレートの代わりに、ポリグリシジルメタクリレートを主成分とした変性ポリマーや他の親水性ポリマーを用いても同様の効果が得られ、4-アミノ-2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン-1-オキシルの代わりに第1表に示したテトラメチルピペリジン-1-オキシル化合物、第2表に示したテトラメチルピペリジン-1-オキシル化合物および第3表に示したジメチルオキサゾリジン-1-オキシル

ず、高感度な測定を安定して行える効果を有するものとなる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明での安定ラジカル化合物濃度と干渉縞強度との関係を示すグラフ、第2図ないし第4図はいずれもこの発明での安定ラジカル化合物の具体例を示す化学構造式を示す図、第5図はレーザ磁気免疫測定方法を説明するための概略構成図である。

- 1 …… 容器、
- 2 …… 電磁石、
- 3 …… 磁極片、
- 4 …… 隆起部分、
- 5 …… レーザ光、
- 6 …… 反射光。

出願人 日本電信電話株式会社

代理人 弁理士 志賀正武

-11-

第 2 表

No.	化 合 物	構 造 式 (第3図中の)
1	3-(アミノエチル)-PROXYL	B-1
2	3-(2-(2-プロモアセタミド)-アセタミド)-PROXYL	B-2
3	3-[2-[2-(2-プロモアセタミド)-エトキシ]エチルカルバモイル]-PROXYL	B-3
4	3-(2-プロモアセタミドメチル)-PROXYL	B-4
5	3-(2-プロモアセタミド)-PROXYL	B-5
6	3-[3-(2-プロモアセタミド)-プロピルカルバモイル]-PROXYL	B-6
7	3-カルバモイル-PROXYL	B-7
8	3-カルボキシ-PROXYL	B-8
9	3-シアノ-PROXYL	B-9
10	3-[5-(ジメチルアミノ)-1-ナフタレンスルホナミド]-PROXYL	B-10
11	3-(5-フルオロ-2,4-ジニトロアニリノ)-PROXYL	B-11
12	3-[2-(2-アイオドアセタミド)アセタミド]-PROXYL	B-12

-13-

第 1 表

No.	化 合 物	構 造 式 (第2図中の)
1	4-アミノ-TEMPO	A-1
2	4-(2-プロモアセタミド)-TEMPO	A-2
3	4-(エトキシフルオロホスフィニル-オキシ)-TEMPO	A-3
4	4-ヒドロキシ-TEMPO	A-4
5	4-(2-アイオドアセタミド)-TEMPO	A-5
6	4-イソチオシアナト-TEMPO	A-6
7	4-マレイミド-TEMPO	A-7
8	4-(4-ニトロベンゾイルオキシ)-TEMPO	A-8
9	4-オクソ-TEMPO	A-9
10	4-ホスホノオキシ-TEMPO-ハイドレイト	A-10

-12-

第 2 表 (つづき)

13	3-[2-(2-(2-アイオドアセタミド)-エトキシ)エチルカルバモイル]-PROXYL	B-13
14	3-(2-アイオドアセタミドメチル)-PROXYL	B-14
15	3-(3-(2-アイオドアセタミド)プロピル-カルバモイル)-PROXYL	B-15
16	3-(2-アイオドアセタミド)-PROXYL	B-16
17	3-[2-(2-イソチオシアナトエトキシ)-エチルカルバモイル]-PROXYL	B-17
18	3-(2-イソチオシアナトエチルカルバモイル)-PROXYL	B-18
19	3-(イソチオシアナトエチル)-PROXYL	B-19
20	3-(3-イソチオシアナトプロピル-カルバモイル)-PROXYL	B-20
21	3-[2-(2-マレイミドエトキシ)-エチルカルバモイル]-PROXYL	B-21
22	3-(2-マレイミドエチルカルバモイル)-PROXYL	B-22
23	3-(マレイミドメチル)-PROXYL	B-23
24	3-(3-マレイミドプロピル-カルバモイル)-PROXYL	B-24
25	3-マレイミド-PROXYL	B-25
26	3-(4-ニトロフェノキシカルボニル)-PROXYL	B-26

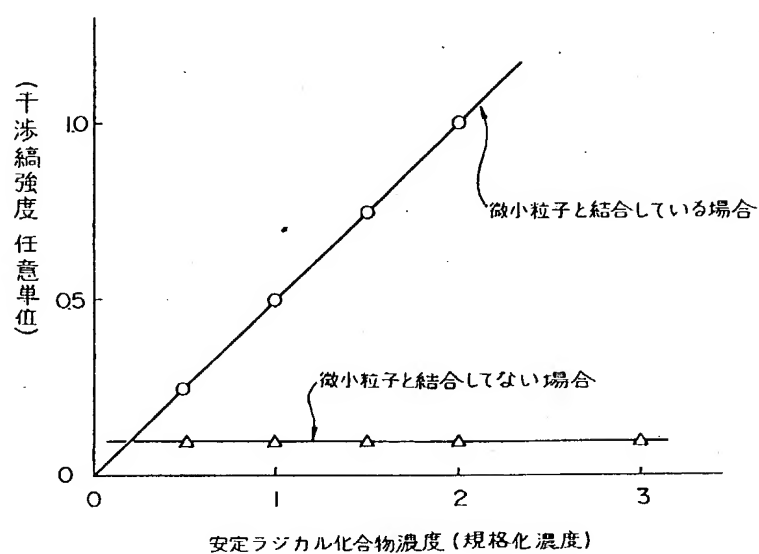
-14-

第 3 表

No.	化 合 物	構 造 式 (第4図中同)
1	3-DOXYL-5 α -コレスタン	C-1
2	DOXYL-シクロヘキサノール	C-2
3	5-DOXYL-デカン	C-3
4	3-DOXYL-17 β -ヒドロキシ-5 α - アンドロスタン	C-4
5	10-DOXYL-ノナデカン	C-5
6	5-DOXYL-ステアリン酸	C-6
7	7-DOXYL-ステアリン酸	C-7
8	12-DOXYL-ステアリン酸	C-8
9	16-DOXYL-ステアリン酸	C-9
10	メチル5-DOXYL-ステアレート	C-10
11	メチル7-DOXYL-ステアレート	C-11
12	メチル12-DOXYL-ステアレート	C-12
13	メチル16-DOXYL-ステアレート	C-13

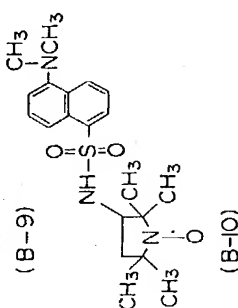
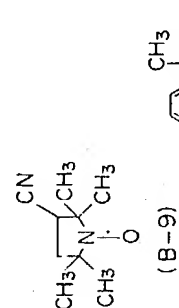
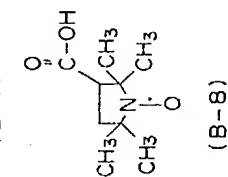
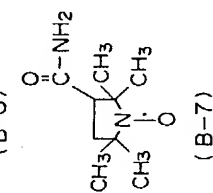
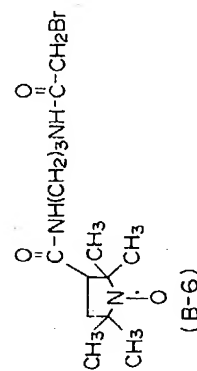
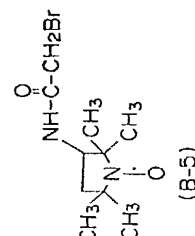
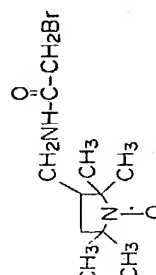
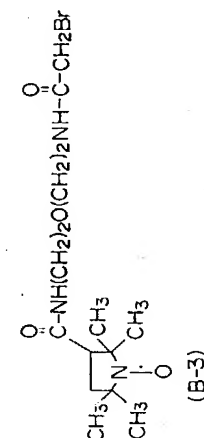
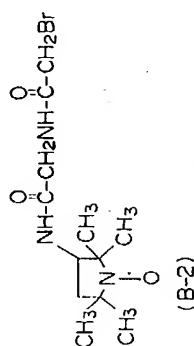
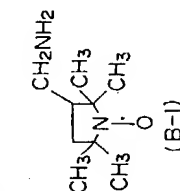
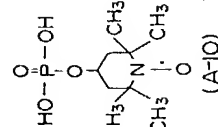
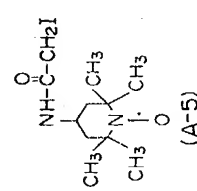
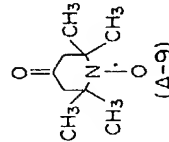
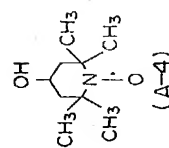
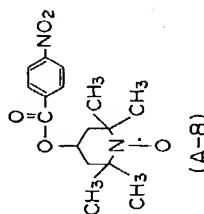
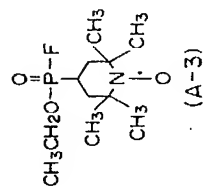
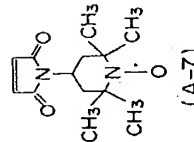
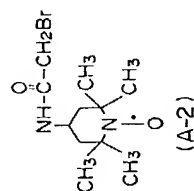
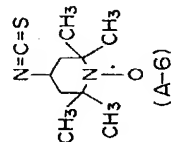
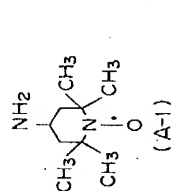
-15-

第 1 図

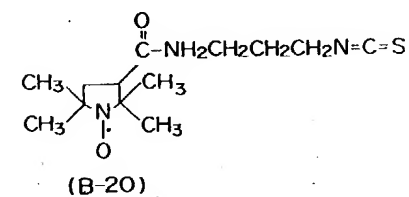
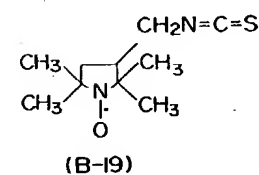
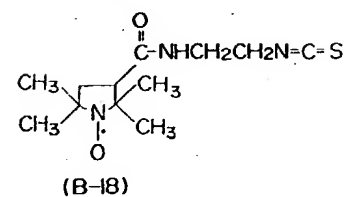
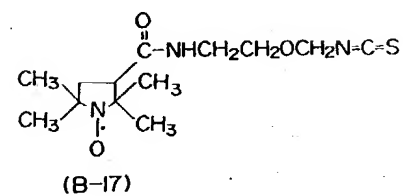
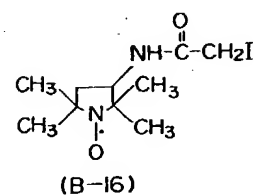
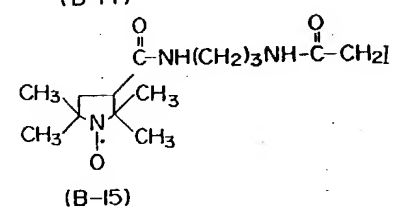
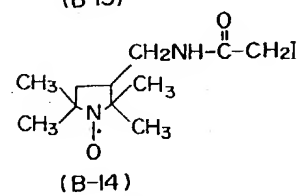
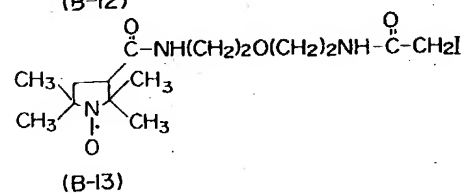
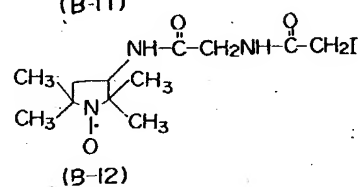
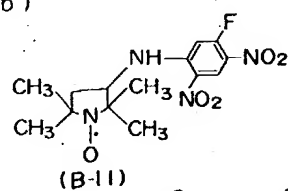


第 3 頁

(a)



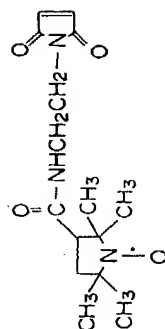
第 3 図 (b)



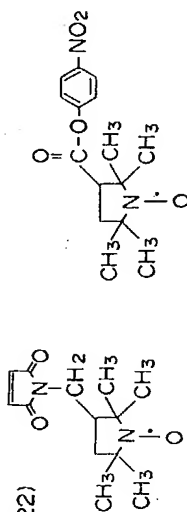
第 3 図 (c)



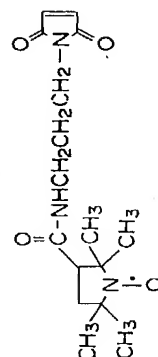
(B-21)



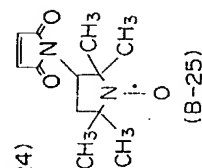
(B-22)



(B-23)

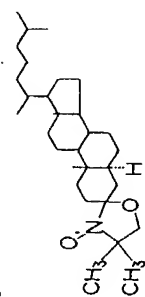


(B-24)

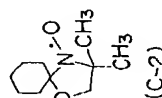


(B-25)

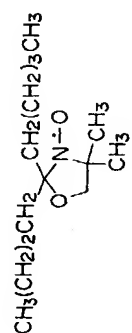
第 4 図 (a)



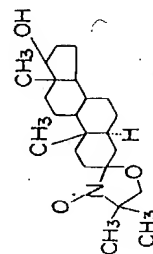
(C-1)



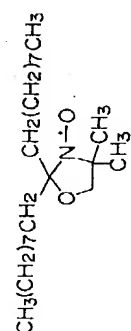
(C-2)



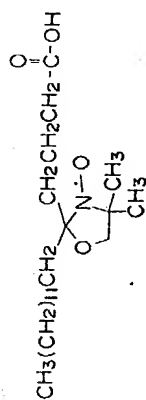
(C-3)



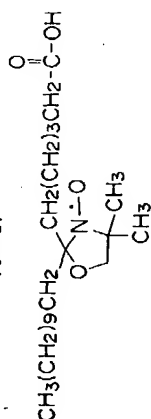
(C-4)



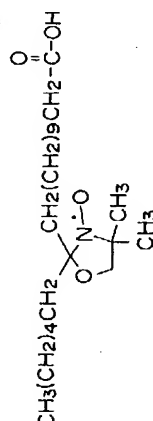
(C-5)



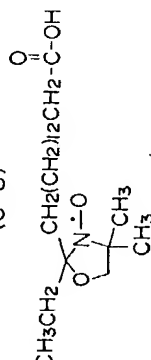
(C-6)



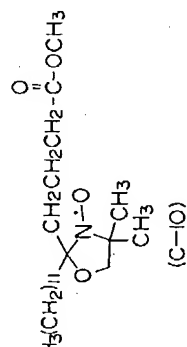
(C-7)



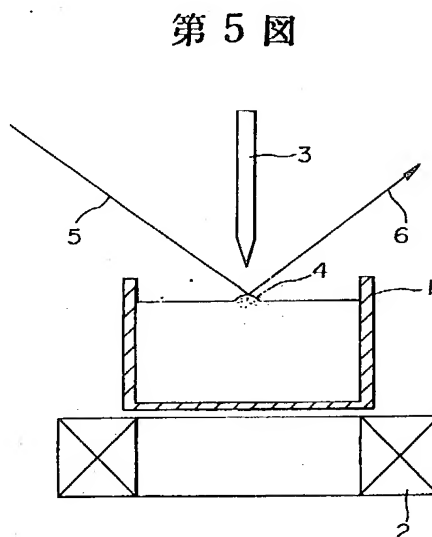
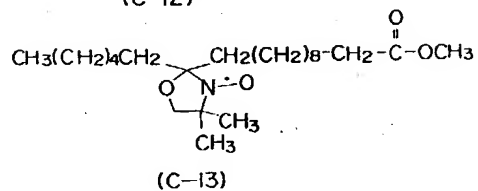
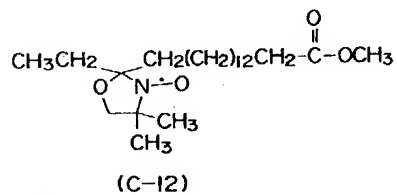
(C-8)



(C-9)



(C-10)



⑤Int. Cl. ⁵

G 01 N 33/543

識別記号

庁内整理番号

Y
E

7906-2 J
7906-2 J